

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 武部 貴則

横浜市立大学大学院医学研究科 臓器再生医学

審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 遠藤 格

副査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 田村 智彦

副査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 中島 淳

博士の学位論文審査結果の要旨

Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant (iPS 細胞由来器官原基移植による血管化ヒト肝臓の創出)

1981 年に個体を構成する多くの細胞へ分化が可能な胚性幹細胞が発見されたことにより、創薬応用や再生医療応用に有益なヒト機能細胞を分化誘導する方法が注目されている。しかし、肝臓などのように複雑な三次元構造を有する臓器においては、いまだ生体レベルの機能細胞への分化誘導は達成されていない。多能性幹細胞を用いた従来の分化誘導系は、器官発生過程で生じる生理的な細胞分化プロセスとは大きく異なり、目的とする単一種の機能細胞のみを平面分化誘導する方法が殆どであった。一般に、臓器を構成する細胞は、機能を担う実質細胞のみならず、血管を形成する血管内皮細胞やそれらを支持する間葉系細胞、血管内腔を流れる血液細胞など複数存在する。そこで、申請者らは複雑な器官発生プロセスの中でも、特にその初期過程に着目することにより、多能性幹細胞から血管などの高次構造が付加された「器官の再構成」を実現化するための培養・移植操作技術を確立した。

審査にあたり上記内容の説明がなされた後、以下の質疑応答がなされた。

まず初めに、中島副査から以下の質問とそれに対する回答があった。

質問 1. 肝臓は免疫細胞による生体防御にも重要な臓器である。hiPSC 由来 liver bud において、免疫細胞、特に NKT、クッパー細胞はどのような状況か。

→現状の方法では、免疫系細胞は存在しないが、肝臓は発生の過程では造血の場でもあり、免疫系細胞については重視している。現在開発中の新たな方法では、造血前駆細胞が同時に分化可能であること、クッパー細胞を始めとして自然免疫系の細胞が出現することなどを確認しており、このような改良法をもちいることで、iPSC-LB のさらなる高機能化も期待できると思われる。NKT などのリンパ球成分は、共培養の系などを用いることが現時点では必要である。

質問 2. 癌オルガノイドなどの研究動向について質問があった。

→癌オルガノイドについては、近年さまざまな癌種において、樹立が相次いでおり、バンク化が試みられている。肝臓分野においても、本年、Nature Medicine にて、イギリスのグループから肝細胞癌、胆管細胞癌、混合型癌の 3 種のオルガノイドを異なる患者より樹立することに成功した論文が報告された。本論文では、ゲノム異常の特徴がプライマリに類似していることや、抗がん剤感受性が患者の反応に近いことが示され注目を集めた。

次に、田村副査から以下のような質問とそれに対する回答があった。

質問 1. hiPSC-LB 移植後の生着に関して、まず hiPSC-LB の細胞は生体内で増殖するのか。そしてどの程度の長期間生着するか。Hepatic endodermal cell の移植だけでは生着しないのか。移植時 hiPSC-LB 内の肝細胞の分化段階はどの程度のものがよいのか。

→増殖については、2-3 回程度移植後も確認されている。生着期間については、何も操作を加えない場合は、血漿タンパク質の生成機能で評価をすると 6 ヶ月程度の機能発現が確認される。

→Hepatic Endoderm 単独移植では、血行再建が十分に行われず、生着は極めて限られてしまう。

→移植時の分化段階については、Day 0-30 にわたって検討し、Hepatic Endoderm を肝芽形成に用いる場合が移植後の機能発現を最大化できることが示されている。

質問 2. 肝切除後に肝臓は大変よく再生する。その際には組織幹細胞が役割を果たしているのか。そのメカニズムと hiPSC-LB 移植の有用性の間には関連があるのか。

→我々が模倣を試みた肝発生と再生のメカニズムは異なる点が多い。肝再生は、主に比較的軽微な障害では、肝細胞の Hypertrophy や Simple Duplication を起点とした再生が、重度の障害では組織前駆細胞を起点とした再生が行われる。後者については、Wnt 経路を活用したメカニズムが重要とされており、それらを活用することで、生検サンプルからの肝上皮オルガノイドの形成が報告されている。しかし、わたしたちの肝芽では、それらと全く異なった分子基盤のもと、発生段階が模倣されており一概に再生との類似性を議論することは困難と思われる。

質問 3. より長期の生着に向けての戦略には、どのようなことが考えられるか。

→胆汁うっ滞による細胞毒性の回避が重要と思われる。したがって、薬物補助療法などでそれらの毒性軽減を目指すアプローチが直近で想定できる。また、胆汁産生そのものを欠損させる遺伝子改変も有効と思われる。将来的には、肝外胆管も含めた連続的再建を検討する必要がある。すでに、初期的な段階の構造物の作出には成功しつつある。これらを用いた移植により、胆管再建の実現可能性があり、生着の長期化が可能になるものと期待できる。

質問 4. hiPSC-LB 移植の際の HLA についてはどう考えるか。

→HLA ホモドナーの利用を想定しているため、免疫抑制剤の軽減が期待できるが、auto の系でさえ一定の免疫拒絶が生じるため、初期の臨床研究ではメジャーアレルの適合が観察されたとしても、十分な免疫抑制が必要と考えられる。

質問 5. 学位研究報告書他の提出書類において、略語の説明や亜急性劇症肝炎モデルの作成法など、若干の追記すべき点が指摘された。

→適切に修正された。

最後に、遠藤主査から以下のような質問とそれに対する回答があった。

質問 1. 毛細胆管は存在するか？その構築に必要な因子は？

→毛細胆管は、現状のシステムでは散発的に確認されるため制御が困難であった。一方、ごく最近の検討で、基底膜マトリクス成分とレチノイン酸を組み合わせてオルガノイド培養を行うことで、計画的に毛細胆管の誘導が可能となっている。一度形成されると、胆汁毒性が大幅に回避することが可能となる。

質問 2. 比較的大きく肝を切除した場合に再生不全が起きてしまうことがあるが、その原因に、毛細胆管に比べ肝細胞が急速に増殖しすぎて適切な肝小葉構造を形成できないことが考えられる。このアンバランスな肝再生は、その速度を遅延させることによって回避できるかもしれない。hiPSC-LB を用いて、肝再生の速度を制御できないか？

→肝オルガノイドを体外循環デバイス内に挿入することで、一時的に肝機能補助を行えば、蛋白合成機能など一部の肝機能の補填が期待されるため、急速な再生を緩やかな再生に傾けることが可能かと推察される。実際、このような人工肝臓を利用した検討は私達の研究室でも着手しており、肝臓再生速度の定量化を今後検証していく必要がある。

その他の質問にも、すべて適切な回答がなされた。本研究は、明確な臨床上の課題解決を目的として行われ、新たな概念を提唱し学術的にも高度でありながら、実用化に極めて近い段階までの画期的な成果をあげているものである。また、申請者の発表と質疑応答も、当該研究についての深い理解と洞察に基づく、質の高いものであった。したがって本申請者は、医学博士を授与されるに十分に相当すると判定された。